For technical assistance please contact:

OTOIMMUNE Diagnostics™
a division of IMMCO Diagnostics, Inc.
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST
E-mail: info@immcodiagnostics.com

or your local distributor

EC REP EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé
EMERGO Europe
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands
Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com

REV.SEPT2010 Document No. PI4190

OTOblot™ Anti-68 kD (hsp-70)* Western Blot

PRODUCT INSERT

Code: 1190 **20 Determinations**

INTENDED USE
A Western Blot assay for the detection and identification of antibodies to the 68 kD (hsp-70) antigen associated with sensorineural hearing loss (SNHL).

SUMMARY AND EXPLANATION
Hearing loss may be caused by a number of conditions. Certain types of hearing loss can be reversed if diagnosed early and appropriate treatment is instituted. Sensorineural hearing loss (SNHL), commonly referred to as nerve deafness, may be caused by genetic or acquired factors such as infections or can be immunologically mediated. Correct diagnosis of SNHL can be made with the aid of a combination of comprehensive patient history and laboratory studies. In the majority of cases, no cause of SNHL is apparent: such cases are referred to as idiopathic SNHL. A subgroup of idiopathic SNHL cases are treatable with immunosuppressive therapy with gratifying results[1,2]. The laboratory work up to identify these cases should include serum antibody tests to 68 kD (hsp-70) inner ear antigen[3-8]. Twenty-two percent of patients with bilateral rapidly progressive SNHL and 30% of the patients with Meniere's disease had antibodies that reacted with 68kD antigen present in the bovine inner ear extracts[7]. Anti-68 kD (hsp-70) antibodies also occur in approximately 60% of patients with bilateral and 35% of patients with unilateral Meniere's Syndrome and 37% of patients with contralateral delayed endolymphatic hydrops. In situations where corticosteroids are contraindicated, methotrexate or cytoxan treatment can be prescribed[9].

PRINCIPLE OF PROCEDURE
This Western Blot immunoassay uses purified recombinant inducible hsp-70 antigen (rhsp-70) from the bovine kidney. During the manufacturing process, recombinant purified hsp-70 kD antigen is mixed with a molecular weight alignment marker of 116 kD. This mixture is then subjected to polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a PVDF membrane. These membranes are cut into 3 mm x 5 cm strips for immunostaining.
To perform the test, strips are incubated with diluted patient serum. Antibodies specifically bind to the rhsp-70 protein on the strip. After proper washing and two incubation steps using Conjugate A and Conjugate B, strips are washed and incubated with a precipitable substrate. Anti-hsp-70 antibody positive reactions appear as a blue-violet band at 70kD.

REAGENTS

Storage and Preparation
Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Do not use, if liquid reagents are turbid or a precipitate is present. Prior to starting the assay, reagents must be equilibrated to room temperature (~22°). Antigen strips can only be used once. Do not interchange components of different lots. Do not use reagents beyond expiration date indicated on labels.

Precautions
All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by US FDA required tests. However, all human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious and good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials must be followed[10].

WARNING - Sodium azide (NaN3) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. NaN_3 is toxic if ingested. Report incidents immediately to laboratory director or poison control center.
Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents.

Materials provided ***Code: 1190***

The OTOblot anti-68 kD (hsp-70) antibody Western Blot kit*, contains sufficient reagents to perform 20 determinations.

1 x 20	Western Blot Strips**, containing rhsp-70.**
1 x 120 µl	***Positive Control *(red vial cap)***
1 x 120 µl	***Negative Control *(yellow vial cap).***
1	Control Card
1 x 250 µl	*Conjugate A **(*blue vial cap)***
1 x 250 µl	*Conjugate B *(white vial cap)*
1 x 60 ml	***Serum Diluent**
1 x 25 ml	***Enzyme Substrate *(amber bottle)***
1 vial	*Powdered Wash Buffer**; reconstitute to one liter with deionized or distilled water.**
3	Assay trays
2	Report Forms

Contains <0.1% NaN_3

Materials Required But Not Provided
- Clean 1000 ml graduated cylinder
- Non-serrated forceps (Filter forceps)
- Rocker or rotating platform shaker
- Absorbent paper or paper towels
- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 10 to 1000 µl
- Disposable pipet tips
- Timer

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING
Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE
Procedural Notes
- Read instructions carefully before starting with the assay.
- Let serum specimens and test reagents equilibrate to room temperature for ~30 minutes prior to starting the test procedure. Return all unused specimens and reagents to the refrigerator promptly after use.
- Proper washing technique is critical to the satisfactory performance of the assay.
- Manipulate test strips with clean forceps only. Do not touch with bare hands.
- Strips are individually numbered at the top of each strip. Assign specimen identification numbers to the respective strips on the Report Form.
- Complete all other relevant information on the Report Form prior to starting the assay.

NOTES:

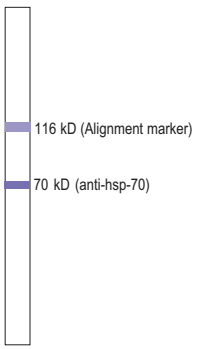

Figure 1

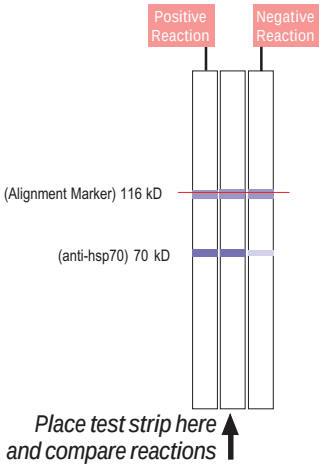

Figure 2

Table 1. Anti-68 kD (hsp-70) Antibodies in Patients with Idiopathic Bilateral SNHL[11]

Disease Group	No. Tested	No. Positive	% Positive
IPBSNHL	72	42	58
Otosclerosis	11	0	0
Cogan's Syndrome	8	0	0
Normals	53	1	2

Table 2. Correlation of Anti-68 kD (hsp-70) Antibody Reactivity to Disease Activity[11]

Disease Activity	Anti-68 kD Antibody
Active	89%
Inactive	0%

Test Method

1. Using blunt forceps, place required number of **Strips** labeled side up into individual wells of the assay tray.
2. Pipet **1.0 ml** of Serum Diluent into each well.
3. Pipet **10 µl** of Positive and Negative Control and patient sample into appropriate wells to obtain a **1:101 dilution**. Incubate **60 minutes** (±5 min.) at room temperature on a rocker or rotating shaker.
4. Aspirate sample solution into waste container. Thoroughly wash strips with Wash Buffer by squirting approximately 2ml of solution directly onto strips. Wash strips with gentle agitation for **5 minutes** and aspirate solution into waste container. **Repeat 2x** for a total of 3 washes **.** *Caution: Complete washing of the strips between incubations is crucial to obtain valid results. Improper washing will result in high background staining.*
5. Pipet **1.0 ml** of Serum Diluent followed by **10 µl** of Conjugate A into each well. Incubate **30 minutes** (±5 min) at room temperature on rocker or rotating shaker.
6. Repeat **Step 4.**
7. Pipet **1.0 ml** of Serum Diluent followed by **10 µl** of Conjugate B into each well. Incubate **30 minutes** (±5 min.) at room temperature on rocker or rotating shaker.
8. Repeat **Step 4.**
9. Pipet **1.0 ml** Substrate into each well and incubate with gentle shaking **10 minutes** (±5 min) at room temperature and reduced light.
10. Stop development using deionized water (2 x 1 minute).
11. Using blunt forceps, remove strips from assay tray and place them gently onto absorbent paper. Handle strips only at the ends and let them dry **15-20 minutes.**

Quality Control

Though the control cards are lot specific, negative and positive controls must be included in each test run to ensure proper performance of the assay.
Positive Control Reaction: The positive control strip will exhibit a dense blue-violet band at 70kD (anti-rhsp-70 band) and the molecular weight alignment marker at 116 kD **(*Figure 1*)**.
Negative Control Reaction: Typically, the negative control will exhibit only one band at the 116 kD molecular weight alignment marker. Any weak band at the 70 kD level on the negative control strip should be **considered the baseline reaction** for that particular test run **(*Figure 2*)**.

RESULTS

Reading and Interpretation Guidelines

The OTOblot™ strips contain two proteins, one at 116 kD and the other is rHSP70 at 70 kD **(Figure 1)**. The 116 kD protein serves as a molecular weight alignment marker.

1. Hold test strip between the positive and negative control reactions on the provided, laminated Control Card and align test strip using the 116 kD molecular weight alignment marker as the reference point **(*Figure 2*)**. A 116 kD marker line on the control cards facilitates accurate alignment of the test strips with the control strips.
2. Compare reaction of test strip with those of the controls on either side. Use of a magnifying glass can facilitate proper alignment of test strips along the molecular weight marker and assist in observation of weak reactions.
3. Check for a crisp band on the test strip that aligns with the 70 kD band on the positive control strip. Such a reaction should be considered positive. Positive reactions can occur in varying intensities from weak to strong. Weak reactions should be compared with baseline reaction intensities at the corresponding position on the negative control strip. Reactions that are distinctly darker or denser than the baseline intensity at 70kD should be considered positive. Occasionally, minor lower molecular weight bandsmay be visible with certain sera. However, such reactions are not relevant and should be considered as negative for antibodies to 68kD (rhsp-70) antigen.

Note: Automated Western blot machines can occassionally show extra bands that may not be related to the 70kD band. Ensure the washing cycle is thorough. Repeat

process manually for clarity.

EXPECTED VALUES

Antibodies to 68 kD (hsp-70) occur in patients with active idiopathic SNHL and antibody titers are shown to correlate with disease activity. See tables 1 and 2 at the end of this document.

Studies evaluating 34 patients with rapidly progressive hearing loss demonstrated that anti-rhsp-70 OTOBlot had 42% sensitivity, 90% specificity, and 91% positive predictive value for predicting steroid responsiveness[12].

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The OTOblot anti-68 kD (hsp-70) antibody Western Blot assay should be used as an aid to diagnosis. Positive results may be found in other autoimmune conditions or certain infectious diseases. Hence results should be evaluated and interpreted by a medical authority in light of the patient's clinical history and other laboratory findings. Some sera may react to the MW marker occasionally, the significance of which is not known.

TROUBLESHOOTING GUIDE

- **Strong band at 68-70kD on Negative Control strip.** Likely cause: contaminated Negative Control vial, or cross contamination from well containing a positive serum.
- **Positive Control appears like Negative Control strip.** Likely cause: Negative Control vial was confused as Positive Control vial.
- **Strips are completely blank.** Likely cause: addition of Conjugate (A or B) or Substrate was omitted.
- **High background and poor contrast between bands and background.** Likely cause: wash step(s) may have been omitted or incorrectly performed, or incubations were overextended.

REFERENCES•REFERENCIAS•LITERATUR•RIFERIMENTI

1. McCabe BF, Autoimmune sensorinerual hearing loss. Ann Otol. 1979; 88:5852- 589.
2. Arnold W, Pfaltz R, Alternalt HJ. Evidence of serum antibodies against inner ear tissues in the blood of patients with certain sensorineural hearing disorders. Acta Otolaryngol (Stockh). 1985; 99:437-444.
3. Harris JP, Sharp PA. Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorinerual hearing loss. Laryngoscope. 1990; 100:516-524.
4. Yamanobe S, Harris JP. Inner ear-specific autoantibodies. Laryngoscope. 1993; 103:319-325.
5. Shin S, Billings P, Keithley EM, Harris JP. Comparison of anti-heat shock protein 70 (anti-shp-70) and anti-68-kD inner ear protein in the sera of patients with meniere's disease. Laryngoscope. 1997; 107:222-227.
6. Harris JP and Aframian D. Role of autoimmunity in contralateral delayed endolymphatic hydrops. Am J Otol. 1994; 15:710-716.
7. Gottschlich S, Billings P, Keithley EM et al. Assessment of serum antibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss and meniere's disease. Laryngoscope. 1995; 105:1347-1352.
8. Billings PB, Keithley EM, Harris JP. Evidence linking the 69 kilodalton antigen identified in progressive sensorineural hearing loss patient sera with heat shock protein 70. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1995; 104:181-188.
9. Sismanis A, Thompson T, Willis HE. Methotrexate therapy for autoimmune hearing loss: a preliminary report. Laryngoscope. 1994; 104:932-934.
10. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1999 [HHS Pub. No. (CDC)93-8395]. –
11. Moscicki RA, San Martin JE, Quintero CH et al. Serum antibody to inner ear proteins in patients with progressive hearing loss - correlation with disease activity and response to corticosteroid treatment. JAMA. 1994; 272:611-616.
12. Hirose K, Werner MH, and Duckert LG. Utility of laboratory testing in autoimmune inner ear disease. Laryngoscope. 1999; 109:1749-1753.

3. Verificar para ver se há uma faixa distinta na tira de teste que alinha com a faixa de 70 kD na tira positiva do controle. Tal reação deve ser considerada positiva. As reações positivas podem ocorrer em intensidades variando de fraco a forte. **As reações fracas devem ser comparadas com as intensidades da reação da linha de base na posição correspondente na tira negativa do controle.** As reações que são distintamente mais escuras ou mais densas do que a intensidade da linha de base em 70kD devem ser consideradas positivas.Ocasionalmente, o peso molecular mais baixo menor faixa seja visível com determinados soro. Entretanto, tais reações não são relevantes e devem ser consideradas como o negativo para anticorpos (rhsp-70) ao antígeno 68kD.

Nota: As máquinas automatizadas do borrão de Western podem mostrar as faixas extra que não podem ser relacionadas à faixa 70kD. Assegurar o ciclo de lavagem é completo. Repetir o processo manualmente para maior clareza.

VALORES PREVISTOS

Os anticorpos a 68 kD (hsp-70) ocorre nos pacientes com titulação idiopático ativos de SNHL e de anticorpo são mostrados ao correlacionado com atividade da doença. Ver as tabelas 1 e 2 na extremidade deste original.

Os estudos que avalíam 34 pacientes com perda de ouvido ràpidamente progressiva demonstraram que anti-rhsp-70 OTOBlot teve a sensibilidade de 42%, o especificação de 90%, e o valor predição positivo de 91% para predizer da resposta aos esteróides (12).

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O teste OTOblot anti-68 kD (hsp-70) deve ser usado como um dae ao diagnóstico. Os resultados positivos podem ser encontrados em outras circunstâncias autoimune ou determinadas doenças infecciosas. Daqui os resultados devem ser avaliados e interpretado por uma autoridade médica na luz do história clínico do paciente e de outros resultados do laboratório. Alguns soro podem reagir ao marcador do MW ocasionalmente, o significado de que não é sabido.

GUIA DE PESQUISA DE DEFEITOS

- **Faixa forte em 68-70kD na tira de Controle Negativo.** Causa provável: frasco contaminado de Controle Negativo, ou contaminação transversal do poço que contem um soro positivo.
- **Controle Positivo aparece como a tira de Controle Negativo.** Causa provável: O frasco de controle negativo foi confundido como o frasco de controle positivo.
- **As tiras são completamente em branco.** Causa provável: adição de Conjugado (A ou B) ou Substrato foram omitidos.
- **Contraste do fundo elevado e dos pobres entre faixas e fundo.** Causa provável: o Etapa da lavagem pode ter sido omitido ou incorretamente executado, ou os incubação prolongado.

immco DIAGNOSTICS

OTOblot™ Anti-68 kD (hsp-70)* Western Blot

Code: 1190 20 Determinations

UTILISATION PRÉVUE

Une analyse de Western Blot pour la détection et l'identification des anticorps à l'antigène de 68 kD (hsp-70) s'est associée à la perte d'audition neuro-sensorielle (SNHL).

SOMMAIRE ET EXPLICATION

La perte d'audition peut être provoquée par un certain nombre de conditions. Certains types de perte d'audition peuvent être renversés si le traitement tôt et approprié diagnostiqué est institué. La perte d'audition neuro-sensorielle (SNHL), généralement désignée sous le nom de la surdité de nerf, peut être provoquée par des facteurs génétiques ou acquis tels que des infections ou peut être immunologiquement négociée. Le diagnostic correct de SNHL peut être fait à l'aide d'une combinaison des études patientes complètes d'histoire et de laboratoire. Dans la majorité de cas, aucune cause de SNHL n'est évidente : de tels cas désigné sous le nom de SNHL idiopathique. Un sous-groupe de cas idiopathiques de SNHL sont traitable avec la thérapie immunosuppressive avec les résultats agréables [1,2]. Le travail de laboratoire identifient jusqu'à ces caisses devrait inclure des essais d'anticorps de sérum à l'antigène d'oreille intérieure de 68 kD (hsp-70) [3-8]. Vingt-deux pour cent de patients avec rapidement SNHL et 30% progressifs bilatéraux des patients présentant la maladie de Meniere ont eu les anticorps qui ont réagi avec de l'antigène 68kD actuel dans l'oreille intérieure extraits [7] de bovin. Les anticorps du Anti-68 kD (hsp-70) se produisent également dans approximativement 60% de patients avec bilatéral et 35% de patients avec Syndrome de Meniere unilatéral et 37% de patients présentant les hydrops endolymphatique retardés contralatéraux. Dans les situations où les corticostéroïdes sont non indiqué, methotrexate ou traitement cytoxan peut être prescrit [9].

PRINCIPE DE PROCÉDÉ

Ce les utilisations immunoessai de Western Blot ont purifié l'antigène hsp-70 induisible de recombinaison (rhsp-70) du rein de bovin. Pendant le processus de fabrication, l'antigène purifié de recombinaison du hsp-70 est mélangé à un marqueur d'alignement de poids moléculaire du 116 kD. Ce mélange est alors soumis à l'électrophorèse de gel de polyacrylamide et transféré à une membrane de PVDF. Ces membranes sont coupées en 3 millimètres X des bandes de 5 centimètres pour immuno- souillure.

Pour réaliser l'essai, des bandes sont incubées avec le sérum patient dilué. Les anticorps lient spécifiquement à la protéine rhsp-70 sur la bande. Après le lavage approprié et deux étapes d'incubation en utilisant Conjugué A et Conjugué B, des bandes sont lavées et incubées avec un substrat précipitable. Les réactions positives de l'anticorps Anti-hsp-70 apparaissent comme bande bleu-violette à 70kD.

RÉACTIFS

Stockage et Preparation

Stockez tous les réactifs à 2-8° C. **Ne gelez pas.** N'employez pas, si les réactifs liquides sont troubles ou un précipité est présent. Avant de commencer l'analyse, des réactifs doivent être équilibrés à la température ambiante (~22°). Des bandes d'antigène peuvent seulement être employées une fois. N'échangez pas les composants de différents sorts. N'employez pas les réactifs au delà de la date d'échéance indiquée sur des étiquettes.

Précautions

Tous les composants dérivés humains utilisés ont été examinés pour HBsAg, HCV, Hiv-1 et

2 et Htlv-i et négatif trouvé par les essais exigés par FDA des USA. Cependant, tous les dérivés humains de sang et spécimens patients devraient être considérés potentiellement infectieux et de bonnes pratiques en matière de laboratoire en stockant, en distribuant et en ayant ces matériaux doivent être suivies [10].
Attention - l'azoture de sodium (NaN3) peut réagir avec le fil et la tuyauterie de cuivre aux azotures fortement explosifs en métal de forme. Sur la disposition des liquides, éclat avec de grands volumes de l'eau pour empêcher l'habillage d'azoture. NaN_3 est toxique s'ingéré. Rapportez les incidents immédiatement au centre de commande de directeur ou de poison de laboratoire.
Suivez les bonnes pratiques en matière de laboratoire de réduire au minimum la contamination microbienne et en travers des réactifs.

Matériaux fournis *Code : 1190*

Le kit contient les réactifs suffisants pour effectuer 20 déterminations.

20	bandelettes Western Blot
1 x 120 µl	*contrôle positif, prêt à l'emploi
1 x 120 µl	*contrôle négatif, prêt à l'emploi
1	carte de contrôe
1 x 250 µl	*conjugué A
1 x 250 µl	*conjugué B
1 x 60 ml	*diluant pour échantillons
1 x 25 ml	*substrat enzymatique
1	tampon de lavage pour 1 litre/flacon
3	bains d'analyse
1	fiches de rapport

** Contient < 0.1% NaN_3*

Matériaux Requis Mais Non fournis

- Nettoyez le cylindre reçu un diplôme 1000 par ml
- forceps non-dentelé
- Culbuteur ou dispositif trembleur tournant de plateforme
- Papier absorbant ou serviettes de papier
- Désionisé ou eau distillée
- Bouteille de compression à l'amortisseur de lavage dilué par prise
- Pipettes capables de fournir 10 à 1000 µl
- Jetable introduisez à la pipette les bouts
- Temporisateur

COLLECTION ET MANIPULATION DE SPÉCIMEN

Seulement des spécimens de sérum devraient être employés dans ce procédé. Hémolysés excessivement, les spécimens lipémiques ou par microbes souillés peuvent interférer l'exécution de l'essai et ne devraient pas être employés. Stockez les spécimens à 2-8° C pour plus qu'une semaine. Pour un entreposage plus prolongé, des spécimens de sérum devraient être gelés. Évitez la congélation et le dégel répétés des échantillons.

Méthode

Notes Procédurales

- Lisez les instructions soigneusement avant commençant par l'analyse.
- Laissez les spécimens de sérum et les réactifs d'essai équilibrer à la température ambiante pendant les minutes ~30 avant de commencer la méthode d'essai. Renvoyez tous les spécimens et réactifs inutilisés au après utilisation de réfrigérateur promptement.
- La technique de lavage appropriée est critique à l'exécution satisfaisante de l'analyse.
- Manoeuvrez les bandes d'essai avec les forceps propres seulement. Ne touchez pas avec les mains nues.
- Des bandes sont individuellement numérotées au dessus de chaque bande. Assignez les numéros d'identification de spécimen aux bandes respectives sur le rapport.
- Remplissez toute autre information appropriée sur le rapport avant de commencer l'analyse.

Testar O Método

1. Usando o fórtceps sem corte, colocar o número requerido do lado etiquetado **tiras** acima em poços individuais da bandeja do teste.
2. Introduzir com pipeta **1.0 ml** de diluente de amostras em cada um bem.
3. Introduzir com pipeta **10 µl** de controle positiv e de controle negativo e amostra paciente em poços apropriados para obter **uma diluição de 1:101.** Incubar **60 minutos** (± 5 minutos.) na temperatura de quarto em um balancim ou em um sacudidor girando.
4. Aspirar a solução da amostra no recipiente resíduo. Lavar completamente tiras com tampão de lavagem esguinchando aproximadamente 2ml da solução diretamente em tiras. Lavar tiras com agitação delicado por **5 minutos** e aspirar a solução no recipiente resíduo. **Repetir 2x.** *Cuidado: A lavagem completa das tiras entre incubaçãos é crucial obter resultados válidos. A lavagem imprópria resultará no fundo elevado que mancha.*
5. Introduzir com pipeta **1.0 ml** de amostras seguido seguido perto **10 µl** de conjugado A em cada um bem. Incubar **30 minutos** (± 5 minutos) na temperatura de quarto no balancim ou no sacudidor girando.
6. Repetir **Etapa 4.**
7. Introduzir com pipeta **1.0 ml** de diluente de amostras seguido perto **10 µl** de conjugado B em cada um bem. Incubar **30 minutos** (± 5 minutos.) na temperatura de quarto no balancim ou no sacudidor girando.
8. Repetir **Etapa 4.**
9. Introduzir com pipeta **1.0 ml** substrato em cada um poço e incubar com delicado agitando **10 minutos** (± 5 minutos) na temperatura de quarto e na luz reduzida.
10. Pare o desenvolvimento usando a água deionized (2 x 1 minutos)
11. Usando o fórtceps sem corte, remover as tiras da bandeja do teste e colocá-las delicadamente no papel absorvente. Segurar tiras somente nas extremidades e deixá-las secar **15-20 minutos.**

Controle De Qualidade

Embora os cartões de controle são específico do lote, os controles negativos e positivos devem ser incluídos em cada funcionamento de teste para assegurar o desempenho apropriado do teste.
Reação do Controle Positivo: A tira positiva do controle exibirá uma faixa azul-violeta densa em 70kD (faixa anti-rhsp-70) e o marcador do alinhamento do peso molecular no 116 kD (***Figure 1***).
Reação do Controle Negativo: Tipicamente, o controle negativo exibirá somente uma faixa no marcador do alinhamento do peso molecular de 116 kD. Toda a faixa fraca no nível de 70 kD na tira negativa do controle deve **ser considerada a reação da linha de base** para esse funcionamento de teste do detalhe (***Figure 2***).

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

As tiras do OTOblot contêm duas proteínas, uma no 116 kD e o outro é rHSP70 no 70 kD ***(Figure 1)***. Os 116 kD proteína saques como um marcador do alinhamento do peso molecular.

1. Prender a tira de teste entre as reações controles positivos e controles negativos fornecido, laminado cartão de controle e alinhar a tira de teste usando o marcador do alinhamento do peso molecular de 116 kD como o ponto de referência (***Figure 2***). Uma linha do marcador de 116 kD nos cartões de controle facilita o alinhamento exato das tiras de teste com as tiras do controle.
2. Comparar a reação da tira de teste com as aquelas dos controles em um ou outro lado. O uso de um vidro ampliando pode facilitar o alinhamento apropriado de tiras de teste ao longo do marcador do peso molecular e ajudá-lo na observação de reações fracas.

infeccioso e as práticas boas do laboratório em armazenar, em dispensar e em dispôr destes materiais devem ser seguidas [10].
Cuidado - o azido de sódio (NaN3) pode reagir com a ligação e o encanamento de cobre aos azidos altamente explosivos do metal do formulário. Em cima da eliminação dos líquidos, resplendor com volumes grandes da água para impedir o acúmulo do azido. NaN_3 é tóxico se mastigado. Relatar incidentes imediatamente ao centro de controle do diretor ou do veneno do laboratório.
Seguir práticas boas do laboratório minimizar a contaminação microbial e transversal dos reagentes.

Materiais fornecidos *Code: 1190*
O jogo de OTOblot anti-68 kD (hsp-70) *, contem reagentes suficientes para executar 20 determinações.

1 x 20	tiras Western Blot
1 x 120 µl	*controle positivo, pronto para uso
1 x 120 µl	*controle negativo, pronto para uso
1	cartão de controle
1 x 250 µl	*conjugado A
1 x 250 µl	*conjugado A
1 x 60 ml	*diluente de amostras
1 x 25 ml	*substrato enzime
1 frasco	tampão de lavagem do 1 litro/viale
3	bandejas do assay
2	relatório

** Contem < 0.1% NaN_3*

Materiais Requeridos Mas Não fornecidos
- Limpar o cilindro graduado 1000 ml
- fórtceps Non-serrilhado
- Balancim ou sacudidor girando da plataforma
- Papel absorvente ou toalhas de papel
- Água desionizado ou destilada
- Frasco do aperto ao amortecedor diluído preensão da lavagem
- Pipetas capazes de entregar o 10 a 1000 µl
- Descartável introduzir com pipeta pontas
- Temporizador

COLEÇÃO E MANIPULAÇÃO DO ESPÉCIME
Somente os espécimes do soro devem ser usados neste procedimento. Hemolizados bruta, os espécimes lipémicos ou microbial contaminados podem interferir com o desempenho do teste e não devem ser usados. Armazenar espécimes em 2-8° C para não mais por muito tempo de uma semana. Para um armazenamento mais longo, os espécimes do soro devem ser congelados. Evitar congelar-se e degelados repetidos das amostras.

PROCEDURE
Notas Processuais
- Ler instruções com cuidado antes de começar com o teste.
- Deixar espécimes do soro e reagentes do teste equilibrado à temperatura de quarto por os minutos ~30 antes de começar o procedimento de teste. Retornar todos os espécimes e reagentes não utilizados ao depois de uso do refrigerador prontamente.
- A técnica de lavagem apropriada é crítica ao desempenho satisfatório do teste.
- Manipular tiras de teste com fórtceps limpos somente. Não tocar com mãos desencapadas.
- As tiras são numeradas individualmente no alto de cada tira. Atribuir números de identificação do espécime às tiras respectivas no relatório.
- Terminar toda informação relevante restante no relatório antes de começar o teste.

Examinez La Méthode
1. En utilisant le forceps émoussé, placez le nombre requis de côté marqué **par les bandelettes Western Blot** vers le haut dans différents puits du plateau d'analyse.
2. Introduisez à la pipette **1.0 ml** du **diluant pour échantillons** dans chacun bien.
3. Introduisez à la pipette **10 µl** du contrôles positif et negatif et échantillon patient dans les puits appropriés pour obtenir **une dilution de 1:101.** Incubez **60 minutes** (± 5 minutes.) à la température ambiante sur un culbuteur ou un dispositif trembleur tournant.
4. Aspirez la solution témoin dans le bac à vidange. Lavez complètement les bandes avec le **tampon de lavage** en injectant approximativement 2ml de solution directement sur des bandes. Lavez les bandes avec l'agitation douce pendant **5 minutes** et aspirez la solution dans le bac à vidange. **Répétez 2x.** *Attention : Le lavage complet des bandes entre les incubations est crucial d'obtenir des résultats valides. Le lavage inexact aura comme conséquence le fond élevé souillant.*
5. Introduisez à la pipette **1.0 ml diluant pour échantillons** suivi **10 µl** de Conjugué A dans chacun bien. Incubez **30 minutes** (± 5 minutes) à la température ambiante sur le culbuteur ou le dispositif trembleur tournant.
6. Répétez **L'Étape 4.**
7. Introduisez à la pipette **1.0 ml diluant pour échantillons** suivi **10 µl** de Conjugué B dans chacun bien. Incubez **30 minutes** (± 5 minutes.) à la température ambiante sur le culbuteur ou le dispositif trembleur tournant.
8. Répétez **L'Étape 4.**
9. Introduisez à la pipette **1.0 ml substrat** dans chacun puits et incubez avec doux en secouant **10 minutes** (± 5 minutes) à la température ambiante et à la lumière réduite.
10. Arrêtez le développement utilisant l'eau désionisée (2 x 1 minutes)
11. En utilisant le forceps émoussé, enlevez les bandes du plateau d'analyse et placez-les doucement sur le papier absorbant. Manipulez les bandes seulement aux extrémités et laissez-les sécher **15-20 minutes.**

Contrôle de qualité
Bien que les cartes de commande soient détail de sort, des commandes négatives et positives doivent être incluses dans chaque essai pour assurer l'exécution appropriée de l'analyse.
Réaction De Contrôle Positive: La bande positive de commande montrera une bande bleu-violette dense à 70kD (bande anti-rhsp-70) et le marqueur d'alignement de poids moléculaire au 116 kD **(*Figure 1*)**.
Réaction De Contrôle Négative: Typiquement, la commande négative montrera seulement une bande au marqueur d'alignement de poids moléculaire de 116 kD. N'importe quelle bande faible au niveau de 70 kD sur la bande négative de commande devrait **être considérée la réaction de ligne de base** pour cet essai de détail **(*Figure 2*).**

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS
Les bandes d'OTOblot contiennent deux protéines, une au 116 kD et l'autre (rHSP70) au 70 kD **(Figure 1)**. Les protéine 116 kD servir de marqueur d'alignement de poids moléculaire.
1. Tenez la bande d'essai entre les réactions de contrôles positives et négatives sur la carte de contrôle fourni et et alignez la bande d'essai en utilisant le marqueur d'alignement de poids moléculaire de 116 kD comme point de référence (*Figure 2*). Une ligne de marqueur de 116 kD sur les cartes de contrôles facilite l'alignement précis des bandes d'essai avec les bandes de contrôle.
2. Comparez la réaction de la bande d'essai à ceux des commandes de chaque côté. L'utilisation d'une loupe peut faciliter l'alignement approprié des bandes d'essai le long du marqueur de poids moléculaire et aider à l'observation des réactions faibles.

3. Vérifiez une bande croquante sur la bande d'essai qui aligne avec la bande de 70 kD sur la bande positive de commande. Une telle réaction devrait être considérée positive. Les réactions positives peuvent se produire dans des intensités variables de faible à fort. **Des réactions faibles devraient être comparées aux intensités de réaction de ligne de base à la position correspondante sur la bande négative de commande.** Des réactions qui sont distinctement plus foncées ou plus denses que l'intensité de ligne de base à 70kD devraient être considérées positives. De temps en temps, le poids moléculaire inférieur mineur bandes peut soit évident avec certains sérums. Cependant, de telles réactions ne sont pas appropriées et devraient être considérées en tant que négatif pour des anticorps à l'antigène 68kD (rhsp-70).

Note : Les machines automatisées de tache de Western peuvent montrer les bandes supplémentaires qui ne peuvent être liées à la bande 70kD. Assurez le cycle de lavage est complet. Répétez le processus manuellement pour la clarté.

VALEURS PRÉVUES

Des anticorps à 68 kD (hsp-70) se produisent dans les patients présentant des titres idiopathiques actifs de SNHL et d'anticorps sont montrés à la corrélation avec l'activité de la maladie. Voir les tableaux 1 et 2 à la fin de ce document.

Les études évaluant 34 patients présentant la perte d'audition rapidement progressive ont démontré qu'anti rhsp-70 OTOBlot a eu la sensibilité de 42%, la spécificité de 90%, et la valeur prédictive positive de 91% pour prévoir la réponse stéroïde (12).

LIMITATIONS DU PROCÉDÉ

L'OTOblot Western Blot anti-68 kD (hsp-70) kit devrait être employée comme aide au diagnostic. Des résultats positifs peuvent être trouvés en d'autres conditions autoimmunes ou certaines maladies infectieuses. Par conséquent des résultats devraient être évalués et interprétés par une autorité médicale à la lumière de l'histoire clinique du patient et d'autres résultats de laboratoire. Quelques sérums peuvent réagir au marqueur de MW de temps en temps, dont la signification n'est pas connue.

GUIDE DE DÉPANNAGE

- **Bande forte à 68-70kD sur la bande de Contrôle Negative.** Cause probable : fiole souillée de **Contrôle Negative,** ou contamination en travers à partir du puits contenant un sérum positif.
- **Contrôle Positif apparaît comme la bande de Contrôle Negative.** Cause probable : La fiole Contrôle Négative a été confondue comme fiole de Contrôle Positif.
- **Les bandes sont complètement blanches.** Cause probable : addition de Conjugué (A ou B) ou Substrat ont été omis.
- **Contraste de fond élevé et de pauvres entre les bandes et le fond.** Cause probable : L'Étape de lavage a pu avoir été omis ou inexactement exécuté, ou des incubations ont été étendues.

immco DIAGNOSTICS

OTOblot™ Anti-68 kD (hsp-70)* Western Blot

Code: 1190 20 Determinations

USO PRETENDIDO

Um teste Western Blot para a deteção e a identificação dos anticorpos ao antígeno de 68 kD (hsp-70) associou com a perda de ouvido sensório-neural (SNHL).

SUMÁRIO E EXPLANAÇÃO

A perda de ouvido pode ser causada por um número de circunstâncias. Determinados tipos de perda de ouvido podem ser invertidos se o tratamento adiantado e apropriado diagnosticado for instituído. A perda de ouvido sensório-neural (SNHL), consultada geralmente como ao surdez do nervo, pode ser causada por fatores genéticos ou adquiridos tais como infecções ou pode imunológico ser mediada. O diagnóstico correto de SNHL pode ser feito com o dae (dispositivo automático de entrada) de uma combinação de estudos pacientes detalhados do história e do laboratório. Na maioria dos casos, nenhuma causa de SNHL é aparente: tais casos são consultados como a SNHL idiopático. Um subgrupo de casos idiopático de SNHL é tratável com terapia imunossupressor com resultados gratos [1,2]. O trabalho do laboratório identifica até estes casos deve incluir testes do anticorpo do soro ao antígeno da orelha interna de 68 kD (hsp-70) [3-8]. Vinte e dois por cento dos pacientes com ràpidamente o SNHL e os 30% progressivos bilateral dos pacientes com doença de Meniere tiveram os anticorpos que reagiram com o antígeno 68kD atual na orelha interna extrato [7] dos Bovídeos. Os anticorpos do Anti-68 kD (hsp-70) ocorrem também em aproximadamente 60% dos pacientes com bilateral e 35% dos pacientes com o síndrome de Meniere unilateral e 37% dos pacientes com hydrops endolymphatic atrasados contralateral. Nas situações onde os corticosteróides estão não indicado, methotrexate ou tratamento cytoxan pode ser prescrito [9].

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

Este teste Western Blot usos o antígeno purifico hsp-70 induzível recombinante (rhsp-70) do rim dos Bovídeos. Durante o processo de manufatura, o antígeno induzível recombinante do hsp-70 kD é misturado com um marcador do alinhamento do peso molecular do 116 kD. Esta mistura então é sujeitada ao electroforese do gel de polyacrylamide e transferida a uma membrana de PVDF. Estas membranas são cortadas em 3 milímetros x tiras de 5 cm para immuno- manchar.

Para executar o teste, as tiras incubado com o soro paciente diluído. Os anticorpos ligam especificamente à proteína rhsp-70 na tira. Após a lavagem apropriada e as duas etapas do incubação usando Conjugado A e Conjugado B, as tiras são lavadas e incubado com uma carcaça precipitado. As reações positivas do anticorpo Anti-hsp-70 aparecem como uma faixa azul-violeta em 70kD.

REAGENTES

Armazenamento e Preparação

Armazenar todos os reagentes em 2-8° C. **Não se congelar.** Não usar, se os reagentes líquidos forem turvo ou um precipitado estiver atual. Antes de começar o teste, os reagentes devem equilibrado à temperatura de quarto (~22°). As tiras do antígeno podem somente ser usadas uma vez. Não intercambiar componentes de lotes diferentes. Não usar reagentes além da data de expiração indicada em etiquetas.

Precauções

Todos os componentes derivados humanos usados foram testados para HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-i e negativo encontrado por testes requeridos FDA dos E. U.. Entretanto, todos os derivativos humanos do sangue e espécimes pacientes devem ser considerados potencial

variazione da debole a forte. **Le reazioni deboli dovrebbero essere paragonate alle intensità di reazione della linea di base alla posizione corrispondente sulla striscia negativa di controllo.** Le reazioni che sono distintamente più scure o più dense dell'intensità della linea di base a 70kD dovrebbero essere considerate positive. Occasionalmente, il peso molecolare più basso secondario fasce possono essere visibili con determinati sieri. Tuttavia, tali reazioni non sono relative e dovrebbero essere considerate come negazione per gli anticorpi all'antigene 68kD (rhsp-70).

Nota: Le macchine automatizzate della macchia di Western possono mostrare le fasce supplementari che non possono essere collegate con la fascia 70kD. Accertare il ciclo di lavaggio è completo. Ripetere manualmente il processo per chiarezza.

VALORI PREVISTI

Gli anticorpi a 68 kD (hsp-70) si presenta in pazienti con i titoli idiopatici attivi dell'anticorpo e di SNHL sono indicati alla componente con attività di malattia. Vedere le tabelle 1 e 2 all'estremità di questo documento.

Gli studi che valutano 34 pazienti con perdita della capacità uditiva velocemente progressiva hanno dimostrato che anti rhsp-70 OTOBlot ha avuto sensibilità di 42%, la specificità di 90% ed il valore di previsione positivo di 91% per la predizione della risposta steroide [12].

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

L'analisi OTOblot anti-68 kD (hsp-70) dovrebbe essere usata come sussidio alla diagnosi. I risultati positivi possono essere trovati in altre circostanze autoimmuni o determinate malattie contagiose. Quindi i risultati dovrebbero essere valutati ed interpretati da un'autorità medica alla luce della storia clinica del paziente e di altri risultati del laboratorio. Alcuni sieri possono reagire occasionalmente all'indicatore di MW, l'importanza di cui non è conosciuta.

GUIDA D'ANALISI GUASTI

- **Fascia forte a 68-70kD sulla striscia di Controllo Negativo.** Causa probabile: fiala contaminata di Controllo Negativo, o contaminazione trasversale dal pozzo che contiene un siero positivo.
- **Controllo Positivo compare come la striscia di Controllo Negativo.** Causa probabile: La fialadi controllo negativo di è stata confusa come fiala di controllo positivo.
- **Le strisce sono completamente in bianco.** Causa probabile: aggiunta di coniugato (A o B) o substrato sono stati omessi.
- **Alta priorità bassa e contrasto insufficiente fra le fasce e la priorità bassa.** Causa probabile: lo punto della lavata può essere omesso o essere effettuato in modo errato, o le incubazioni erano sovraestese.

OTOblot™
Anti-68 kD (hsp-70)* Western Blot

Code: 1190 **20 Determinations**

USO PREVISTO

Un análisis de Western Blot para la detección y la identificación de anticuerpos al antígeno de 68 kD (hsp-70) se asoció a la pérdida de oído sensori-neural (SNHL).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La pérdida de oído se puede causar por un número de condiciones. Ciertos tipos de pérdida de oído pueden ser invertidos si se instituye el tratamiento temprano y apropiado diagnosticado. La pérdida de oído sensori-neural (SNHL), designada comúnmente sordera del nervio, se puede causar por factores genéticos o adquiridos tales como infecciones o puede ser mediada inmunológico. La diagnosis correcta de SNHL se puede hacer con la ayuda de una combinación de los estudios pacientes comprensivos de la historia y del laboratorio. En la mayoría de casos, no hay causa de SNHL evidente: tales casos se refieren como SNHL idiopático. Un subgrupo de casos idiopático de SNHL es tratable con terapia inmunosupresiva con los resultados gratificantes [1,2]. El trabajo del laboratorio hasta identifica estos casos debe incluir pruebas del anticuerpo del suero al antígeno del oido interno de 68 kD (hsp-70) (3-8). Veintidós por ciento de pacientes con rápidamente SNHL y el 30% progresivos bilaterales de los pacientes con la enfermedad de Meniere tenían anticuerpos que reaccionaron con el antígeno 68kD presente en el oido interno extracto [7] de los bóvidos. Los anticuerpos Anti-68 kD (hsp-70) también ocurren en el aproximadamente 60% de pacientes con bilateral y el 35% de pacientes con síndrome de Meniere unilateral y el 37% de pacientes con los hydrops endolymphatic retrasados contralaterales. En situaciones donde están los corticoesteroides no indicado, methotrexate o tratamiento cytoxan se puede prescribir [9].

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Este las aplicaciones immuno-ensayo de Western Blot purificaron el antígeno recombinación hsp-70 (rhsp-70) del riñón de los bóvidos. Durante el proceso de fabricación, el antígeno purificado recombinación del hsp-70 se mezcla con un marcador de la alineación del peso molecular del 116 kD. Esta mezcla después se sujeta al electroforesis del gel de polyacrylamide y se transfiere a una membrana de PVDF. Estas membranas se cortan en 3 milímetros x las tiras de 5 centímetros para immuno-mancharse.

Para realizar la prueba, las tiras se incuban con el suero paciente diluido. Los anticuerpos atan específicamente a la proteína rhsp-70 en la tira. Después del lavado apropiado y de dos pasos de la incubación usando conjugado A y conjugado B, las tiras se lavan y se incuban con un substrato precipitado. Las reacciones positivas del anticuerpo Anti-hsp-70 aparecen como banda azul-violeta en 70kD.

REACTIVOS

Almacenaje y preparación

Almacenar todos los reactivo en 2-8° C. **No congelar.** No utilizar, si los reactivo líquidos son turbios o un precipitado está presente. Antes de comenzar el análisis, los reactivo se deben equilibrear a la temperatura ambiente (~22°). Las tiras del antígeno se pueden utilizar solamente una vez. No intercambiar los componentes de diversas porciones. No utilizar los reactivo más allá de la fecha de vencimiento indicada en etiquetas.

Precauciones

Todos los componentes derivados humanos usados han sido probados para HBsAg, HCV,

Hiv-1 y 2 y Htlv-i y negativa encontrada por las pruebas requeridas FDA de los E.E.U.U. Sin embargo, todos los derivados humanos de la sangre y especímenes pacientes se deben considerar potencialmente infecciosos y las buenas prácticas del laboratorio en almacenar, dispensar y disponer de estos materiales deben ser seguidas [10].
Precaución - el azide de sodio (NaN3) puede reaccionar con el plomo y la plomería de cobre a los ázidas altamente explosivos del metal de la forma. Sobre la disposición de líquidos, rubor con los volúmenes grandes de agua para prevenir la acumulación del ázida. NaN_3 es tóxico si está injerido. Divulgar los incidentes inmediatamente al centro de control del director o del veneno del laboratorio.
Seguir las buenas prácticas del laboratorio de reducir al mínimo la contaminación microbiana y cruzada de reactivo.

Materiales proporcionados *Code: 1190*

El OTOblot anti-68 kD (hsp-70) kit *, contiene los suficientes reactivo para realizar 20 determinaciones.

1 x 20	tiras Western Blot
1 x 120 µl	*control positivo, listo para uso
1 x 120 µl	*control negativo, listo para uso
1	tarjeta de control
1 x 250 µl	*conjugado A
1 x 250 µl	*conjugado B
1 x 60 ml	*tampón de dilución para muestras
1 x 25 ml	*substrato enzimático
1 frasco	tampón de lavado para 1 litro/vial
3	bandejas de análisis
2	Hojas de informe

** Contiene < 0.1% NaN_3*

Materiales Requeridos Pero No proporcionados
- Limpiar el cilindro graduado 1000 ml
- Fórceps No-serrado
- Eje de balancín o coctelera de la plataforma que rota
- Papel absorbente o toallas de papel
- Agua desionizada o destilada
- Botella del apretón al almacenador intermediario diluido asimiento de la colada
- Pipetas capaces de entregar 10 a 1000 µl
- Disponible medir con una pipeta las extremidades
- Contador de tiempo

COLECCIÓN Y DIRECCIÓN DEL ESPÉCIMEN
Solamente los especímenes del suero se deben utilizar en este procedimiento. Hemolizadas grueso, los especímenes lipémicas o microbiano contaminados pueden interferir con el funcionamiento de la prueba y no deben ser utilizados. Almacenar los especímenes en 2-8° C para no más de largo de una semana. Para un almacenaje más largo, los especímenes del suero deben ser congelados. Evitar congelar y deshelar repetidos de muestras.

Método

Notas Procesales
- Leer las instrucciones cuidadosamente antes comenzando con el análisis.
- Dejar los especímenes del suero y los reactivo de la prueba equilibrear a la temperatura ambiente por los minutos ~30 antes de comenzar el método de prueba. Volver todos los especímenes y reactivo inusitados al uso posterior del refrigerador puntualmente.
- La técnica que se lava apropiada es crítica al funcionamiento satisfactorio del análisis.
- Manipular las tiras de prueba con los fórceps limpios solamente. No tocar con las manos peladas.
- Las tiras se numeran individualmente en la tapa de cada tira. Asignar los números de identificación del espécimen a las tiras respectivas en la Hoja de informe.

Verificare Il Metodo

1. Per mezzo del forcipe smussato, disporre il numero richiesto di lato identificato **strisce** in su nei diversi pozzi del vassoio di analisi.

2. Pipettare **1.0 ml** di diluente per campioni in ciascuno.

3. Pipettare **10 µl** di controllo positivo e di controllo negativo e campione paziente nei pozzi adatti per ottenere **una diluzione di 1:101.** Incubare **60 minuti** (± 5 minuti.) alla temperatura ambiente su un attuatore o su un agitatore di rotazione.

4. Aspirare la soluzione del campione nel contenitore di rifiuti. Lavare completamente le strisce con tampone di lavaggio erogazione approssimativamente 2ml della soluzione direttamente sulle strisce. Lavare le strisce con agitazione delicata per **5 minuti** ed aspirare la soluzione nel contenitore di rifiuti. **Ripetere 2x.** *Attenzione: Il lavaggio completo delle strisce fra le incubazioni è cruciale da ottenere i risultati validi. Il lavaggio improprio provocherà l'alta priorità bassa che macchia.*

5. Pipettare **1.0 ml** di diluente per campioni seguito bene **10 µl** di coniugato A in ciascuno. Incubare **30 minuti** (± 5 minuti) alla temperatura ambiente sull'attuatore o sull'agitatore di rotazione.

6. Ripetere **Punto 4.**

7. Pipettare **1.0 ml** di diluente per campioni seguito bene **10 µl** di coniugato B in ciascuno. Incubare **30 minuti** (± 5 minuti.) alla temperatura ambiente sull'attuatore o sull'agitatore di rotazione.

8. Ripetere **Punto 4.**

9. Pipettare **1.0 ml** substrato in ciascuno pozzo ed incubare con delicato agitando **10 minuti** (± 5 minuti) alla temperatura ambiente ed alla luce ridotta.

10. Arresti lo sviluppo usando l'acqua deionizzata (2 x 1 minuto)

11. Per mezzo del forcipe smussato, rimuovere le strisce dal vassoio di analisi e disporle delicatamente su carta assorbente. Maneggiare le strisce soltanto alle estremità e lasciarle asciugare **15-20 minuti.**

Controllo di qualità
Benchè le schede di controllo siano lotto specifico, i comandi negativi e positivi devono essere inclusi in ogni elaborazione di prova per accertare le prestazioni adeguate dell'analisi.
Reazione di Controllo Positivo: La striscia positiva di controllo esibirà una fascia blu-viola densa a 70kD (fascia anti-rhsp-70) e l'indicatore di allineamento del peso molecolare 116 kD (***Figure 1***).
Reazione di Controllo Negativo: Tipicamente, il controllo negativo esibirà soltanto una fascia all'indicatore di allineamento del peso molecolare dei 116 kD. Tutta la fascia debole al livello dei 70 kD sulla striscia negativa di controllo dovrebbe **essere considerata la reazione della linea di base** per quell'elaborazione di prova di particolare (***Figure 2***).

RESULTI
Le strisce del OTOblot contengono due proteine, una a 116 kD e l'altro è rHSP70 a 70 kD ***(Figure 1)***. I 116 kD proteina e da indicatore di allineamento del peso molecolare.

1. Tenere il nastro di prova fra le reazioni do controllo positivo e controllo negativo sul fornito scheda di controllo laminato ed allineare il nastro di prova usando l'indicatore di allineamento del peso molecolare dei 116 kD come il punto di riferimento (***Figure 2***). Una linea dell'indicatore dei 116 kD sulle schede di controllo facilita l'allineamento esatto dei nastri di prova con le strisce di controllo.

2. Paragonare la reazione del nastro di prova a quelle dei comandi da qualsiasi lato. L'uso di una lente d'ingrandimento può facilitare l'allineamento adeguato dei nastri di prova lungo l'indicatore del peso molecolare ed aiutare nell'osservazione delle reazioni deboli.

3. Controllare per vedere se c'è una fascia croccante sul nastro di prova che si allinea con la fascia dei 70 kD sulla striscia positiva di controllo. Una tal reazione dovrebbe essere considerata positiva. Le reazioni positive possono accadere nelle intensità di

umani di anima ed esemplari pazienti dovrebbero essere considerati potenzialmente contagiosi e le buone pratiche del laboratorio nella memorizzazione, nell'erogazione e nell'avere dei questi materiali devono essere seguite [10].
Attenzione - l'azide di sodio (NaN3) può reagire con cavo e l'impianto idraulico di rame agli azoturi altamente esplosivi del metallo della forma. Su eliminazione dei liquidi, a livello di grandi volumi di acqua per impedire accumulazione dell'azoturo. NaN_3 è tossico se ingerito. Segnalare immediatamente gli avvenimenti al centro di controllo del direttore o del veleno del laboratorio.
Seguire le buone pratiche del laboratorio minimizzare la contaminazione microbica e trasversale dei reagenti.

Materiali forniti *Code: 1190*
Il corredo di OTOblot anti-68 kD (hsp-70) Western Blot *, contiene i reagenti sufficienti per realizzare 20 determinazioni.

1 x 20	strisce Western Blot
1 x 120 µl	*controllo positivo, pronto al uso
1 x 120 µl	*controllo negativo, pronto al uso
1	scheda di controllo
1 x 250 µl	*coniugato A
1 x 250 µl	*coniugato B
1 x 60 ml	*diluente per campioni
1 x 25 ml	*substrato enzimatico
1 fiala	tampone di lavaggio per 1 litro/fiala
3	bagni di analisi
2	moduli di rapporto

** Contiene < 0.1% NaN_3*

Materiali Richiesti Ma Non forniti
- Pulire il cilindro laureato 1000 ml
- forcipe Non-seghettato
- Attuatore o agitatore di rotazione della piattaforma
- Carta assorbente o tovaglioli di carta
- Deionizzato o acqua distillata
- Bottiglia di compressione all'amplificatore della lavata diluito stretta
- Pipette capaci di trasporti del 10 – 1000 µl
- A gettare pipettare le punte
- Temporizzatore

ACCUMULAZIONE E MANEGGIAMENTO DELL'ESEMPLARE
Soltanto gli esemplari del siero dovrebbero essere usati in questa procedura. Grossolanamente emolizzati, gli esemplari lipemici o da microbi contaminati possono interferire con le prestazioni della prova e non dovrebbero essere usati. Immagazzinare gli esemplari a 2-8° C per più che una settimana. Per immagazzinaggio più di lunga durata, gli esemplari del siero dovrebbero essere congelati. Evitare il congelamento e lo scioglimento ripetuti dei campioni.

METODO
Note Procedurali
- Leggere con attenzione prima le istruzioni cominciando dall'analisi.
- Lasciare gli esemplari del siero ed i reagenti della prova equilibrare alla temperatura ambiente per il resoconto ~30 prima dell'iniziare il metodo di prova. Restituire subito tutti gli esemplari e reagenti inutilizzati alla post-utilizzazione del frigorifero.
- La tecnica di lavaggio adeguata è critica alle prestazioni soddisfacenti dell'analisi.
- Maneggiare i nastri di prova con i forcipi puliti soltanto. Non toccare con le mani nude.
- Le strisce sono numerate individualmente alla parte superiore di ogni striscia. Assegnare i numeri di identificazione dell'esemplare alle strisce rispettive sul moduli di rapporto.
- Completare tutte le altre informazioni relative sul moduli di rapporto prima dell'iniziare l'analisi.

- Terminar el resto de la información relevante sobre la Hoja de informe antes de comenzar el análisis.

Probar El Método
1. Con el fórceps embotado, poner el número requerido del lado etiquetado **tiras** para arriba en los pozos individuales de la bandeja del análisis.
2. Medir con una pipeta **1.0 ml** de tampón de dilución en cada uno bien.
3. Medir con una pipeta **10 µl** de control positivo y de negativo y muestra paciente en pozos apropiados para obtener **una dilusión de 1:101.** Incubar **60 minutos** (± 5 minutos.) en la temperatura ambiente en un eje de balancín o una coctelera que rota.
4. Aspirar la solución de la muestra en el recipiente para residuos. Lavar a fondo las tiras con tampón de lavado arrojando a chorros aproximadamente 2ml de la solución directamente sobre tiras. Lavar las tiras con la agitación apacible por **5 minutos** y aspirar la solución en el recipiente para residuos. **Repetir 2x.** *Precaución: El lavado completo de las tiras entre las incubaciones es crucial obtener resultados válidos. El lavado incorrecto dará lugar al alto fondo que se mancha.*
5. Medir con una pipeta **1.0 ml** de tampón de dilución seguidos por **10 µl** de conjugado A en cada uno bien. Incubar **30 minutos** (± 5 minutos) en la temperatura ambiente en eje de balancín o la coctelera que rota.
6. Repetir **El Paso 4.**
7. Medir con una pipeta **1.0 ml** de tampón de dilución seguidos por **10 µl** de conjugado B en cada uno bien. Incubar **30 minutos** (± 5 minutos.) en la temperatura ambiente en eje de balancín o la coctelera que rota.
8. Repetir **El Paso 4.**
9. Medir con una pipeta **1.0 ml** substrato en cada uno pozo e incubar con apacible sacudariendo **10 minutos** (± 5 minutos) en la temperatura ambiente y la luz reducida.
10. Pare el desarrollo usando el agua desionizada (2 x 1 minuto)
11. Con el fórceps embotado, quitar las tiras de la bandeja del análisis y ponerlas suavemente sobre el papel absorbente. Manejar las tiras solamente en los extremos y dejarlos secar **15-20 minutos.**

Control de calidad
Aunque las tarjetas de control son específico de la porción, los controles negativos y positivos se deben incluir en cada funcionamiento de prueba para asegurar el funcionamiento apropiado del análisis.
Reacción Control Positivo: La tira positiva del control exhibirá una banda azul-violeta densa en 70kD (banda anti-rhsp-70) y el marcador de la alineación del peso molecular en el 116 kD (***Figure 1***).
Reacción Control Negativo: Típicamente, el control negativo exhibirá solamente una banda en el marcador de la alineación del peso molecular de 116 kD. Cualquier banda débil en el nivel de 70 kD en la tira negativa del control se debe **considerar la reacción de la línea de fondo** para ese funcionamiento de prueba del detalle (***Figure 2***).

RESULTADOS
Las tiras del OTOblot contienen dos proteínas, una en el 116 kD y el otro es rHSP70 en el 70 kD ***(Figure 1)***. Los 116 kD servicios de la proteína del como marcador de la alineación del peso molecular.
1. Llevar a cabo la tira de prueba entre las reacciones del control positivas y control negativas en el proporcionado, laminado tarjeta de control y alinear la tira de prueba usando el marcador de la alineación del peso molecular de 116 kD como el punto de referencia (***Figure 2***). Una línea del marcador de 116 kD en las tarjetas de control facilita la alineación exacta de las tiras de prueba con las tiras del control.
2. Comparar la reacción de la tira de prueba con las de los controles de cualquier lado. El uso de una lupa puede facilitar la alineación apropiada de las tiras de prueba a lo largo

del marcador del peso molecular y asistir a la observación de reacciones débiles.

3. Comprobar para saber si hay una banda quebradiza en la tira de prueba que alinea con la banda de 70 kD en la tira positiva del control. Tal reacción se debe considerar positiva. Las reacciones positivas pueden ocurrir en intensidades que varían de débil a fuerte. **Las reacciones débiles se deben comparar con intensidades de la reacción de la línea de fondo en la posición correspondiente respecto a la tira negativa del control.** Las reacciones que son distintamente más oscuras o más densas que la intensidad de la línea de fondo en 70kD se deben considerar positivas. De vez en cuando, el peso molecular más bajo de menor importancia bandas pueden ser visibles con ciertos sueros. Sin embargo, tales reacciones no son relevantes y se deben considerar como negativa para los anticuerpos al antígeno 68kD (rhsp-70).

Nota: Los instuments automatizados para la Western Blot pueden causar las vendas adicionales no relacionadas con la banda 70kD. Asegurar el ciclo que se lava es cuidadoso. Repetir el proceso manualmente para la claridad.

VALORES PREVISTOS

Los anticuerpos a 68 kD (hsp-70) ocurre en pacientes con títulos idiopáticos activos de SNHL y del anticuerpo se demuestran al correlativo con actividad de la enfermedad. Ver las tablas 1 y 2 en el extremo de este documento.

Los estudios que evaluaban a 34 pacientes con pérdida de oído rápidamente progresiva demostraron que contra rhsp-70 OTOBlot tenía sensibilidad del 42%, la especificidad del 90%, y el valor profético positivo del 91% para predecir la sensibilidad esteroide [12].

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El análisis de OTOblot anti-68 kD (hsp-70) se debe utilizar como ayuda a la diagnosis. Los resultados positivos se pueden encontrar en otras condiciones autoinmunes o ciertas enfermedades infecciosas. Por lo tanto los resultados se deben evaluar e interpretar por una autoridad médica en la luz de la historia clínica del paciente y de otros resultados del laboratorio. Algunos sueros pueden reaccionar al marcador del MW de vez en cuando, la significación de el cual no se sabe.

GUÍA DE LOCALIZACIÓN DE AVERÍAS

- **Banda fuerte en 68-70kD en la tira de Control Negativo.** Causa probable: frasco contaminado de Control Negativo, o contaminación cruzada del pozo que contiene un suero positivo.
- **Control Positivo aparece como la tira de Control Negativo. Causa probable:** El frasco de Control Negativo fue confundido como frasco de Control Positivo.
- **Las tiras están totalmente en blanco.** Causa probable: adición de conjugado (A o B) o substrato fueron omitidos.
- **Contraste del alto fondo y de los pobres entre las bandas y el fondo.** Causa probable: el paso(s) de la colada pudo haber sido omitido o haber sido realizado incorrectamente, o las incubaciones fueron extendidas demasiado.

immco DIAGNOSTICS

OTOblot™
Anti-68 kD (hsp-70)* Western Blot

Code: 1190 20 Determinations

USO PROGETTATO

Un'analisi di Western Blot per la rilevazione e l'identificazione degli anticorpi all'antigene dei 68 kD (hsp-70) si è associata con perdita della capacità uditiva neuro-sensoriale (SNHL).

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

La perdita della capacità uditiva può essere causata da un certo numero di circostanze. Determinati tipi di perdite della capacità uditiva possono essere invertiti se il trattamento iniziale ed adatto diagnosticato è istituito. La perdita della capacità uditiva neuro-sensoriale (SNHL), citata comunemente come sordità del nervo, può essere causata dai fattori genetici o acquistati quali le infezioni o può essere mediata immunologicamente. La diagnosi corretta di SNHL può essere fatta con l'aiuto di una combinazione delle ricerche pazienti complete di laboratorio e di storia. Nella maggior parte dei casi, non c'è nessuna causa di SNHL apparente: tali casi si riferiscono a come SNHL idiopatico. Un sottogruppo di casi idiopatico di SNHL è trattabile con la terapia immunosopressiva con i risultati piacevoli [1,2]. Il lavoro del laboratorio fino a identifica questi casi dovrebbe includere le prove dell'anticorpo del siero all'antigene dell'orecchio interno dei 68 kD (hsp-70) (3-8). Ventidue per cento dei pazienti con velocemente SNHL e 30% progressivi bilaterali dei pazienti con la malattia del Meniere hanno avuti anticorpi che hanno reagito con l'antigene 68kD presente nell'orecchio interno estratto [7] del bovino. Anticorpi Anti-68 kD (hsp-70) del inoltre si presentano in circa 60% dei pazienti con bilaterale e 35% dei pazienti con sindrome del Meniere unilaterale e 37% dei pazienti con i hydrops endolimphatico in ritardo controlaterali. Nelle situazioni dove i corticosteroidi sono non indicato, methotrexate o trattamento cytoxan può prescriversi[9].

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Questo gli usi immuno-analisi di Western Blot hanno purificato hsp-70 l'antigene viscoelastico ricombinante (rhsp-70) dal rene del bovino. Durante il processo di fabbricazione, l'antigene purificato ricombinanto del hsp-70 è mescolato con un indicatore di allineamento del peso molecolare di 116 kD. Questa miscela allora è sottoposta all'elettroforesi del gel di poliacrilammide ed è trasferita ad una membrana di PVDF. Queste membrane sono tagliate in 3 millimetri x lle strisce da 5 centimetri per immuno- macchiatura.

Per effettuare la prova, le strisce sono incubate con il siero paziente diluito. Gli anticorpi specificamente si legano alla proteina rhsp-70 sulla striscia. Dopo il lavaggio adeguato e due punti di incubazione usando coniugato A e coniugato B, le strisce sono lavate ed incubate con un substrato precipitabile. Le reazioni positive dell'anticorpo Anti-hsp-70 compaiono come fascia blu-viola a 70kD.

REAGENTI

Immagazzinaggio e Preparazione

Immagazzinare tutti i reagenti a 2-8° C. **Non congelare**. Non usare, se i reagenti liquidi sono torbidi o un precipitato è presente. Prima dell'iniziare l'analisi, i reagenti devono essere equilibrati alla temperatura ambiente (~22°). Le strisce dell'antigene possono essere usate soltanto una volta. Non interscambiare i componenti dei lotti differenti. Non usare i reagenti oltre la data di scadenza indicata sulle etichette.

Precauzioni

Tutte le componenti derivate umane usate sono state esaminate a HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-i e negazione trovata dalle prove richieste FDA degli Stati Uniti. Tuttavia, tutti i derivati

2. Reaktion des Teststreifens mit denen der Kontrollen auf beiden Seiten vergleichen. Gebrauch eines Vergrößerungsglases kann korrekte Ausrichtung der Teststreifen entlang der Molekulargewichtmarkierung erleichtern und in der Beobachtung der schwachen Reaktionen unterstützen.

3. Auf ein klares Band auf dem Teststreifen überprüfen, der mit dem 70 kD Band auf dem positiven Steuerstreifen übereinstimmt. Solch einer Reaktion sollte als positiv gelten. Positive Reaktionen können in unterschiedlichen Intensität von schwachem zu starkem auftreten. **Schwache Reaktionen sollten mit Grundlinie Reaktion Intensität in der entsprechenden Position auf dem negativen Steuerstreifen verglichen werden.** Reaktionen, die deutlich dunkler oder dichter sind, als die Grundlinie Intensität an 70kD sollten als positiv gelten. Gelegentlich ist das kleine unterere Molekulargewicht, die Bänder können, mit bestimmten Seren sichtbar. Jedoch sind solche Reaktionen nicht relevant und sollten als Negativ für Antikörper zum Antigen 68kD (rhsp-70) betrachtet werden.

Anmerkung: Automatisierte Western Fleckmaschinen können Extrabänder zeigen, die möglicherweise nicht mit dem Band 70kD zusammenhängen können. Den waschenden Zyklus sicherstellen ist vollständig. Prozeß für Klarheit manuell wiederholen.

ERWARTETE WERTE

Antikörper bis 68 kD (hsp-70) bei Patienten mit aktiven idiopathisch SNHL und Antikörpertitern auftreten, werden zum Korrelat mit Krankheittätigkeit gezeigt. Tabellen 1 und 2 am Ende dieses Dokumentes sehen.

Die Studien, die 34 Patienten mit schnell progressivem Verlust der Hörfähigkeit auswerten, zeigten, daß Anti- rhsp-70 OTOBlot die 42% Empfindlichkeit hatte, die 90% Besonderheit und 91% den positiven vorbestimmten Wert für das Voraussagen des Steroide-Reaktionsvermögens (12).

BESCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Die OTOblot Probe sollte als Hilfsmittel für Diagnose verwendet werden. Positive Resultate können in anderen autoimmunen Bedingungen oder in bestimmten ansteckenden Krankheiten gefunden werden. Folglich sollten Resultate durch eine medizinische Berechtigung im Licht der klinischen Geschichte des Patienten und anderer Laborentdeckungen ausgewertet werden und gedeutet werden. Einige Seren können zur MW Markierung gelegentlich reagieren, dessen Bedeutung nicht bekannt.

ÜBERPRÜFUNGSFÜHRER

- **Starkes Band an 68-70kD auf Negative Kontrollle Streifen.** Wahrscheinliche Ursache: verschmutzte Negative Kontrolle Phiole oder Kreuzverschmutzung vom Brunnen, der ein positives Serum enthält.
- **Positive Kontrolle erscheint wie Negative Kontrolle Streifen.** Wahrscheinliche Ursache: Negative Kontrolle Phiole wurde als Positive Kontrolle Phiole verwirrt.
- **Streifen sind vollständig leer.** Wahrscheinliche Ursache: Hinzufügung von Konjugat (A oder B) oder Substrat wurden ausgelassen.
- **Kontrast des hohen Hintergrundes und der Armen zwischen Bändern und Hintergrund.** Wahrscheinliche Ursache: Wäsche Schritt kann ausgelassen worden sein oder falsch durchgeführt worden sein, oder Ausbrütungen wurden übernommen.

immco DIAGNOSTICS

OTOblot™ Anti-68 kD (hsp-70)* Western Blot

Code: 1190 20 Determinations

BEABSICHTIGTER GEBRAUCH

Eine Western Blot Probe für die Abfragung und die Kennzeichnung der Antikörper zum 68 kD (hsp-70) Antigen verband mit neurosensorialem Verlust der Hörfähigkeit (SNHL).

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Verlust der Hörfähigkeit kann durch eine Anzahl von Bedingungen verursacht werden. Bestimmte Arten des Verlusts der Hörfähigkeit können aufgehoben werden, wenn bestimmte frühe und passende Behandlung eingeleitet wird. Der neurosensoriale Verlust der Hörfähigkeit (SNHL), allgemein gekennzeichnet als Nerv Taubheit, kann durch die genetischen oder erworbenen Faktoren wie Infektion verursacht werden oder kann immunologisch vermittelt werden. Korrekte Diagnose von SNHL kann mit dem Hilfsmittel einer Kombination der kompletten geduldigen Geschichte und Laborstudien gebildet werden. In der Mehrheit einen Fällen, ist keine Ursache von SNHL offensichtlich: solche Fälle gekennzeichnet als idiopathisch SNHL. Eine Untergruppe der idiopathisch SNHL Fälle sind mit immunosuppressiver Therapie mit erfreulichen Resultaten (1.2) umgänglich. Die Laborarbeit kennzeichnen bis diese Fälle sollte Serumantikörper- Tests 68 kD (hsp-70) zum Innenohrantigen (3-8) einschließen. Zweiundzwanzig Prozent Patienten mit bilateralem schnell progressivem SNHL und 30% der Patienten mit Krankheit Menieres hatten Antikörper, die mit dem Antigen 68kD reagierten, das im Innenohr Extrakt (7) des rinderartigen Tiers vorhanden ist. Anti-68 kD (hsp-70) Antikörper treten auch in ungefähr 60% von Patienten mit bilateralem und 35% von Patienten mit Syndrom einseitigen Menieres und 37% von Patienten mit kontralateralen verzögerten endolymphatisch hydrops auf. In den Situationen, in denen Corticosteroide sind, nicht angezeigt, methotrexate oder cytoxan Behandlung können vorgeschrieben werden (9).

GRUNDREGEL DES VERFAHRENS

Dieses Western Blot reinigte Probe Gebrauch rekombinant durch Induktion erhältliches Antigen hsp-70 (rhsp-70) von der Tierniere. Während des Herstellungsverfahrens wird rekombinant gereinigtes hsp-70 Antigen mit einer Molekulargewichtausrichtung Markierung von 116 kD gemischt. Diese Mischung wird dann Polyacrylamidgelelektrophorese unterworfen und gebracht auf eine PVDF Membrane. Diese Membranen werden in 3 Millimeter x die 5 Zentimeter Streifen für das Immuno- Beflecken geschnitten.

Um den Test durchzuführen, werden Streifen mit verdünntem geduldigem Serum ausgebrütet. Antikörper binden spezifisch an das Protein rhsp-70 auf dem Streifen. Nach korrekter Reinigung und zwei Ausbrütungschritten mit Konjugat A und Konjugat B, werden Streifen mit einem präzipitierbaren Substrat gewaschen und ausgebrütet. Positive Reaktionen des Antikörpers Anti-hsp-70 erscheinen als blau-violettes Band an 70kD.

REAGENS

Ablage und Vorbereitung

Alle Reagenzien an 2-8° C speichern. **Nicht einfrieren.** Nicht verwenden, wenn flüssige Reagenzien trüb sind, oder ein Niederschlag anwesend ist. Vor dem Beginnen der Probe, müssen Reagenzien zur Raumtemperatur (~22°) abgeglichen werden. Antigenstreifen können nur einmal benutzt werden. Bestandteile der unterschiedlichen Lose nicht austauschen. Reagenzien über dem Verfallsdatum hinaus nicht benutzen, das auf Aufklebern angezeigt wird.

Vorkehrungen

Alle menschlichen abgeleiteten benutzten Bestandteile sind auf HBsAg, HCV, Hiv-1 und 2 und Htlv-i und gefundenes Negativ durch US FDA erforderliche Tests geprüft worden. Jedoch sollten alle menschlichen Blutableitungen und geduldigen Probestücke als möglicherweise ansteckend gelten und gute Laborpraxis, in der Speicherung, dem Zuführen und dieser Materialien entledigend, muß gefolgt werden [10].

ACHTUNG - Natrium Azid (NaN3) kann mit Leitung und kupferner Klempnerarbeit explosiven Aziden der Form reagieren zu den in hohem Grade Metall. Nach Beseitigung der Flüssigkeiten, bündiges mit große Volumen Wasser, zum von von Azidanhäufung zu verhindern. NaN_3 ist giftig, wenn es eingenommen wird. Ereignissen Labordirektor oder -giftsteuermitte sofort berichten.

Guter Laborpraxis folgen, Mikroben- und Kreuzverschmutzung der Reagenzien herabzusetzen.

Materialien bereitgestellt *Code: 1190*

Der OTOblot anti-68 kD (hsp-70) Antikörper Western Blot Installationssatz *, enthält genügende Reagenzien, um 20 Ermittlungen durchzuführen.

1 x 20	Western Blot Streifen
1 x 120 µL	*Positive Kontrolle, gebrauchsfertig
1 x 120 µL	*Negative Kontrolle, gebrauchsfertig
1	Kontrollkarte
1 x 250 µL	*Konjugat A
1 x 250 µL	*Konjugat B
1 x 60 ml	*Gepuffertes Probendiluent
1 x 25 ml	*Enzym Substrat
1 Phiole	Waschpuffer für je 1 Liter
3	Assay Wannen
2	Report Formulare

** Enthält < 0.1% NaN_3*

Materialien Erfordert Aber Nicht Bereitgestellt

- 1000 ml graduierten Zylinder säubern
- Nicht-gezackte Zange
- Schalthebel oder drehender Plattformschüttel-Apparat
- Saugfähiges Papier oder Papiertücher
- Entionisiert oder destilliertes Wasser
- Pressungflasche zu Einfluß verdünntem Wäschepuffer
- Pipetten fähig zum Liefern von von µ 10 bis 1000 L
- Wegwerf Spitzen pipettieren
- Timer

PROBESTÜCK-ANSAMMLUNG UND BEHANDLUNG

Nur Serumprobestücke sollten in diesem Verfahren benutzt werden. Hämolytische grob, können lipämische oder durch Mikroben verschmutzte Probestücke die Leistung des Tests behinderen und sollten nicht verwendet werden. Probestücke an 2-8° C für nicht mehr als eine Woche speichern. Für längere Lagerung sollten Serumprobestücke eingefroren werden. Das wiederholte Einfrieren und das Auftauen der Proben vermeiden.

METHODE

Verfahrensanmerkungen

- Anweisungen beginnend mit der Probe sorgfältig vorher lesen.
- Serumprobestücke und Testreagenzien zur Raumtemperatur für Minuten ~30 vor dem Beginnen des Testverfahrens abgleichen lassen. Alle unbenutzten Probestücke und Reagenzien zum Nachgebrauch des Kühlraums sofort zurückbringen.
- Korrekte waschende Technik ist zur ordnungsgemäßen Erfüllung der Probe kritisch.
- Teststreifen mit nur sauberen Zangen manipulieren. Nicht mit den bloßen Händen berühren.

- Streifen werden einzeln an der Oberseite jedes Streifens numeriert. Probestückkennummern den jeweiligen Streifen auf dem Report Formulare zuweisen.
- Alle weiteren relevanten Informationen über das Report Formulare vor dem Beginnen der Probe durchführen.

Methode Prüfen

1. Mit stumpfer Zange erforderliche Zahl **der Streifen** beschrifteten Seite oben in einzelne Brunnen des Probe Behälters setzen.
2. **1.0 ml** von Probendiluent in jedes gut pipettieren.
3. **µ L** von Positive und von Negative Kontrolle und geduldige Probe in passende Brunnen pipettieren **10, um eine 1:101 Verdünnung** zu erreichen. **60 Minuten** (± 5 Minuten.) ausbrüten bei der Raumtemperatur auf einem Schalthebel oder einem drehenden Schüttel-Apparat.
4. Beispiellösung in Abfallbehälter ansaugen. Streifen mit Waschpuffer gänzlich waschen, indem Sie ungefähr 2ml der Lösung direkt auf Streifen sprizen. Streifen mit leichter Bewegung für **5 Minuten** waschen und Lösung in Abfallbehälter ansaugen. **2x wiederholen.** *Vorsicht: Komplette Reinigung der Streifen zwischen Ausbrütungen ist entscheidend, gültige Resultate zu erreichen. Unsachgemäße Reinigung ergibt den hohen befleckenden Hintergrund.*
5. **1.0 ml** von Probendiluent pipettieren gut gefolgt von **10 µL** von Konjugat A in jedes. **30 Minuten** (± 5 Minuten) bei der Raumtemperatur auf Schalthebel oder drehendem Schüttel-Apparat ausbrüten.
6. **Schritt 4** wiederholen.
7. **1.0 ml** von Probendiluent pipettieren gut gefolgt von **10 µL** von Konjugate B in jedes. **30 Minuten** (± 5 Minuten.) ausbrüten bei der Raumtemperatur auf Schalthebel oder drehendem Schüttel-Apparat.
8. **Schritt 4** wiederholen.
9. **1.0 ml** Substrat in jedes pipettieren Brunnen und mit leichtem ausbrüten, **10 Minuten** (± 5 Minuten) bei der Raumtemperatur und bei verringertem Licht rüttelnd.
10. Stoppen Sie Entwicklung unter Verwendung des entionisierten Wassers (2 x 1 Minute)
11. Mit stumpfer Zange Streifen vom Probe Behälter entfernen und sie auf saugfähiges Papier leicht setzen. Streifen nur an den Enden anfassen und sie **15-20 Minuten** trocknen lassen.

Qualitätskontrolle

Obwohl die Steuerkarten Losbesondere sind-, müssen negative und positive Kontrollen in jedem Probelauf eingeschlossen werden, um korrekte Leistung der Probe sicherzustellen. *Positive Kontrollereaktion:* Der positive Steuerstreifen stellt ein dichtes blau-violettes Band an 70kD (Band anti-rhsp-70) und die Molekulargewichtausrichtung Markierung bei 116 kD aus **(*Figure 1*)**.

Negative Kontrollereaktion: Gewöhnlich stellt die negative Steuerung nur ein Band an der 116 kD Molekulargewicht-Ausrichtung Markierung aus. Jedes schwachen Bandes auf dem 70 kD Niveau auf dem negativen Steuerstreifen sollte **gelten als die Grundlinie Reaktion** für diesen Einzelheitprobelauf **(*Figure 2*).**

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die OTOblot Streifen enthalten zwei Proteine, eins bei 116 kD und das andere ist rHSP70 bei 70 kD (Figure 1). Die 116 kD Protein ist ein Molekulargewichtausrichtung Markierung.

1. Teststreifen zwischen den positiven und negativen Steuerreaktionen auf dem zur Verfügung gestellten, lamellierten Kontrollkarte halten und Teststreifen mit der 116 kD Molekulargewicht-Ausrichtung Markierung als der Bezugspunkt ausrichten **(*Figure 2*)**. Eine die 116 kD Markierung Linie auf den Steuerkarten erleichtert genaue Ausrichtung der Teststreifen mit den Steuerstreifen.